

浙江蝮蛇 (*Agkistrodon halys* Pallas) 毒激肽释放酶 I 酶解产物激肽的鉴定

王心民* 戚正武

(中国科学院上海生物化学研究所)

至今已知的蛇毒激肽释放酶作用于激肽原后都释放舒缓激肽, 仅食鱼蝮 (*Agkistrodon piscivorus piscivorus*) 蛇毒激肽释放酶既释放舒缓激肽, 又释放胰激肽 (Iwanaga, 1979)。今对浙江蝮蛇毒激肽释放酶 I 作用于激肽原后的产物作了鉴定, 证实也是舒缓激肽。因此蝮蛇毒激肽释放酶不同于哺乳动物的组织激肽释放酶, 后者释放胰激肽 (Fiedler, 1979)。

材 料 和 方 法

一、材料

激肽释放酶按前文 (王心民, 戚正武) 分离提纯, 激肽增强肽衍生物 Ile-Pro-Pro 三肽由同实验室同志制备提供; 牛血系上海大场牛羊肉经营部供给。合成舒缓激肽 (BK) 为上海生物化学研究所东风生化试剂厂产品。

二、方法

1. 激肽释放酶的生物活力, 用离体豚鼠回肠收缩法测定, 见前文 (王心民, 戚正武)。

2. 双向层析、高压电泳

将样品点于新华 3 号滤纸 (50×50 厘米) 左下方, 距边缘约 8 厘米, 反复点样和吹干, 放入层析箱内平衡 2 小时, 然后放入溶剂槽内, 下行层析, 约 40 小时。溶剂系统为正丁醇: 醋酸: 水 = 4: 1: 5, 取有机相。取出后晾干, 转 90° 置于电泳支架上, 喷电泳缓冲液 (吡啶: 醋酸: 水 = 100: 4: 896, pH 6.5) 约 50 毫升, 放入高压电泳槽内, 电泳仪为美国 Gilson 公司产品。在 2000 伏电压, 100 毫安电流条件下电泳 1 小时 45 分。停后取出晾干。喷 0.05% 茚三酮丙酮溶液约 20 毫升, 50°C 烘箱保温 1 小时显色。

3. N 末端测定

* 北京医学院生化教研组。
本文 1983 年 1 月 17 日收到。

取5—10nM样品,溶于约0.2毫升67%吡啶溶液中,加入400微克DABITC(4-N, N—二甲氨基偶氮苯—4'—硫氰酸酯),再加2滴吡啶,通氮气封管,摇匀后置50°C水浴保温2小时,用氮气吹干后,用正庚烷/乙酸乙酯(3:1)抽提,2000rpm离心3分钟,弃上清液,反复5—6次直至上清液无黄色为止,氮气吹干;加入40%三氟醋酸约0.1毫升裂解,通氮气封管,50°C水浴保温50分钟,通氮气吹干;加25微升左右无水乙醇溶解,点样于聚酰胺薄膜(3×3厘米)上,作定位标记的二乙胺和乙醇胺也点于同一点上,双向层析。先走第1相(醋酸:水=1:2),吹干至无醋酸味后,转90°再走第2相(甲苯:正丁烷:烷醋酸=2:1:1),吹干后,置浓盐酸瓶口上显色。

结果和讨论

一、高分子量(HMW)与低分子量(LMW)激肽原的初步分离纯化

1. 牛血浆的制备

取EDTA30克,葡萄糖100克溶于1立升水中,再加入含1.5克苯甲基磺酰氟(PMSF)的异丙醇溶液500毫升,加水至2立升,混匀,置于塑料桶内。将新鲜牛血30立升左右倒入桶内,混匀,4°C下离心2500rpm,上清液约8立升,置于塑料桶中。

2. DEAE—纤维素(DE—22)吸附

将2.5立升DE—22纤维素(预先用含0.1M NaCl的0.02M Tris—HCl, pH7.5缓冲液平衡),倒入血浆中,于冰库(7°C)中搅拌1小时使蛋白吸在纤维素上,静置1小时,吸出上清液,将纤维素装入层析柱内(8×65厘米,内壁涂有硅油)。先用3立升平衡液洗柱,然后用4立升含0.6M NaCl的0.02M Tris—HCl缓冲液洗脱,流速约500毫升/小时,收集于塑料桶中(桶内预先放入200毫升0.5%PMSF)。收集液对水透析。

3. CM—纤维素(CM—32)吸附

取800毫升CM—32纤维素(预先用0.05M 醋酸 pH5.2缓冲液平衡)倒入上述收集液(配至与缓冲液相同的浓度与pH)中,于7°C下搅拌1小时,静置1小时,倾出上清液(内含有LMW—激肽原Komiya, M. et al., 1974a, b, c)。将CM—32纤维素装入层析柱(5×40厘米),用0.1—0.8M NaCl梯度洗脱,总体积2000毫升, pH5.2,用塑料瓶收集,每瓶250毫升。第3—7瓶收集液经蛇毒激肽释放酶或胰蛋白酶作用后有激肽释放,此即HMW—激肽原部分。由于血浆中前激肽释放酶的活力未能完全抑制,在4—7瓶中自发激活严重,因而只取第3瓶收集液透析、冻干。

4. DEAE—纤维素(DE—22)柱层析

CM—32不吸附部分(倾出之上清液),透析后调pH7.5,在塑料桶中与1800毫升DE—22纤维素(用含0.1M NaCl的0.02M Tris—HCl, pH7.5缓冲液平衡,搅拌1小时,7°C),静置1小时,吸出上清液,将DE—22纤维素装入层析柱(7.5×50厘米)。先用1立升平衡液洗柱,然后用含0.4M NaCl的0.02M Tris—HCl缓冲液洗脱,用塑料瓶收集,每瓶400毫升,经生物活力测定,激肽原部分在第4—6瓶,即为LMW—激肽原,没有自发激活现象,因为血浆激肽释放酶一般不作用于LMW—激肽原。合并此部分,透析,冻干,约得12克。

5. LMW—激肽原的进一步纯化

将上述粗制 LMW—激肽原称取 3 克, 溶于 40 毫升 0.01M 磷酸缓冲液, pH8.0, 70°C 水浴加热 2 分钟, 冰水浴速冷; 45,000rpm 超速离心 30 分钟, 弃沉淀。用 0.5NHCl 将上清液调至 pH4.9, 再次超速离心 30 分钟, 弃沉淀, 取上清液。此时上清液中 90% 的杂蛋白被除去, 所剩的 LMW—激肽原虽仍含杂质, 但已可作为测定蛇毒激肽释放酶活力的底物及其酶解产物了。

二、蛇毒激肽释放酶 I 对 LMW—激肽原的酶解

取上述部分纯化的 LMW—激肽原上清液 20 毫升, 加 5×10^{-4} M EDTA 溶液 2.2 毫升, 并调 pH 至 8.0, 于 37°C 水浴中预先保温 40 分钟, 取 10 微升测生物活力, 表明无游离激肽存在。加入蝮蛇毒激肽释放酶 I 冻干粉 5 毫克, 搅匀, 保温 1 小时, 每隔 10—15 分钟取 10 微升监测生物活力, 结果表明活力不断增高, 至 1 小时后反应平衡, 每毫升样品约释放相当于 20 微克合成舒缓激肽(BK), 20 毫升总释放量约 400 微克, 真空冷冻干燥。

三、酶解产物的分离纯化

1. 80% 甲醇抽提

将上述酶解后的 LMW—激肽原冻干粉置于塑料离心管中, 加入 20 毫升 80% 甲醇, 搅拌抽提 2 小时。3500rpm 离心 30 分钟, 吸出上清液, 在旋转蒸发器上浓缩至干。加水 1.0 毫升, 取 1 微升样品测生物活力, 约相当于 0.2 微克合成 BK, 总量约相当 200 微克合成 BK。

2. 双向高压电泳层析

上述抽提液浓缩后点样于新华 3 号滤纸 (50×50 厘米) 上 (方法见“材料与方法”节), 进行双向层析电泳。结束后, 晾干滤纸, 喷 0.05% 茚三酮溶液, 置于 50°C 烘箱内保温显色 2 小时, 有极淡的斑点产生, 圈下, 并用标准的合成 BK 以同样方法做对照。层析电泳图谱如下。

四、活性产物的鉴定

1. 双向层析电泳图谱

层析电泳后滤纸上的斑点分别剪下, 剪成细条置于小试管中, 加 0.01N 醋酸 2 毫升, 浸泡过夜。测定浸泡液的生物活力, 结果表明, 在激肽释放酶 I 酶解释放产物的图谱上, 只有相应于标准合成 BK 的一点有激肽的生物活力, 而其它点均无活力 (图 1)。二者在层析上的 Rf 值也极为相似, 标准 BK 的 Rf 值为 0.40 (16 厘米/40 厘米), 释放的有激肽活力的产物 Rf 值为 0.41 (18 厘米/43 厘米)。

2. 活性产物 N 末端的鉴定

经 Edman 微量法 (方法见“材料和方法”节) 测定表明, 释放的活性产物 N 末端为精氨酸 (图 2), 与舒缓激肽的 N 末端相同。这就基本可以确定, 激肽释放酶 I 所释放的激肽是舒缓激肽, 而不是胰激肽等其它激肽。

3. 舒缓激肽增强肽 (BPP) 对释放产物的增强作用

前文曾报导浙江蝮蛇毒 (BPP) 十一肽的 C 末端三肽仍具有明显的舒缓激肽增强活性 (Chi Cheng-wu et al., 1982), 因而用此合成的三肽 Ile-Pro-Pro 测定对释放产物的生物活力增强效应。与合成 BK 相同, 释放产物的活力也同样可以被此合成三肽增强, 其

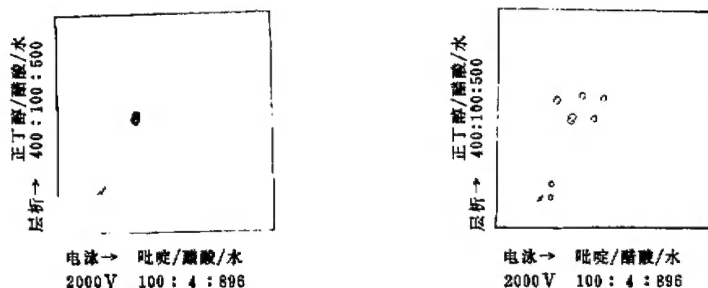


图1 酶解释放产物的双向层析、电泳图谱

左: 标准合成舒缓激肽(BK)。右: 激肽释放酶I的酶解释放产物。× 原点 O 有生物活力的点

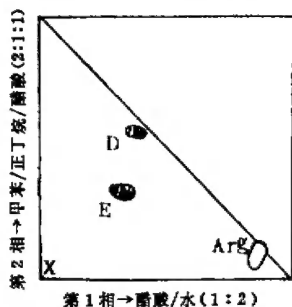


图2 N末端氨基酸的聚酰胺薄膜中层析图谱

原点× 标记 D 二乙胺 E 乙二胺

增强幅度与相应量的合成BK相似(图3)。从而排除了释放产物是其它激肽的可能性, 因BPP只对舒缓激肽具有增强效应。

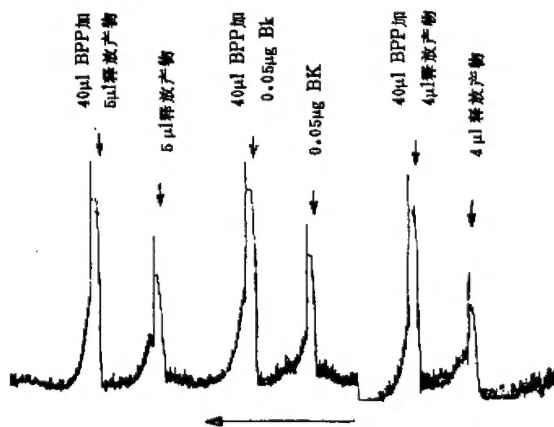


图3 BPP(Ile-Pro-Pro)对释放产物活力的增强作用

结 论

1. 从牛血浆中初步分离纯化高分子量激肽原及低分子量激肽原, 前者由于在提取过程中有自发激活, 得率较低, 而后者得率较高。

2. 浙江蝮蛇毒激肽释放酶 I 作用于低分子量激肽原后, 其酶解产物经分离提纯后, 通过层析电泳、N 末端及生物活力测定, 证实为舒缓激肽。

参 考 文 献

- Iwanaga, S. and Suzuki, T. 1979 Enzymes in snake venom. in *Snake Venom*. 118. Chen-Yuan Lee (ed.), Springer Press, Berlin.
- Fiedler, F. 1979 Enzymology of glandular kallikreins. *Handb. Exp. Pharm.* 25 Suppl. 103, Erdős, E. G. (ed.) Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- 王心民, 戚正武 浙江蝮蛇毒激肽释放酶 I 的分离纯化及其性质的研究. (生物化学与生物物理学报, 待发表)
- Komiya, M. et al. 1974 Bovine plasma Kininogens. I. Further purification of high molecular weight kininogen and its physicochemical properties. *J. Biochem.* a 76, 811.
- Komiya, M. et al. 1974 Bovine plasma kininogens. II. Micro-heterogeneities of high molecular weight kininogens and their structural relationships. *J. Biochem.* b 76, 823.
- Komiya, M. et al. 1974 Bovine plasma kininogens. III. Structural comparison of high molecular weight and low molecular weight kininogens. *J. Biochem.* c 76, 833.
- Chi Cheng-wu et al. 1982 Structure-function studies on the bradykinin potentiating peptide from Chinese snake venom (*Aghistrodon halys Pallas*). *Agents and Actions Supplements* 9, 282, Fritz, H. et al. (Eds.), Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Stuttgart.

CHARACTERIZATION OF THE KININ RELEASED BY
KALLIKREIN I FROM SNAKE VENOM
(*AGKISTRODON HALYS* PALLAS)

Wang Xinmin* and Qi Zhengwu

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

The HMW-kininogen and LMW-kininogen from the bovine plasma were partially purified. Contrary to the LMW-kininogen, the yield of HMW-kininogen was rather low as a result of the spontaneous activation by plasma kallikrein during the separation.

The digestion product released from the LMW-kininogen by kallikrein I from the snake venom (*Agkistrodon halys* Pallas) was purified. This kinin was confirmed as bradykinin on the base of the behavior on the paper chromatography and high voltage electrophoresis, the N-terminal residue determination as well as the biological assay.

* Department of Biochemistry, Beijing Medical College.